

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 691 558**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/04 (2006.01)

C12Q 1/06 (2006.01)

C12Q 1/58 (2006.01)

G01N 31/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.02.2016 PCT/IB2016/051015**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.09.2016 WO16139558**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.02.2016 E 16712511 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.07.2018 EP 3240907**

54 Título: **Detección ultrarápida de Helicobacter Pylori en biopsias de mucosas gástricas**

30 Prioridad:

03.03.2015 IT FR20150002

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

27.11.2018

73 Titular/es:

**CAGNONI, MARCO (100.0%)
Via Adolfo Venturi 18
00162 Roma, IT**

72 Inventor/es:

**IOVINE, VALENTINA y
CAGNONI, MARCO**

74 Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

ES 2 691 558 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Detección ultrarápida de *Helicobacter Pylori* en biopsias de mucosas gástricas

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a una composición de diagnóstico en forma de solución acuosa para detectar muy rápidamente la presencia de *Helicobacter Pylori* en muestras de biopsia extraídas durante el análisis por endoscopia, y para evaluar la carga bacteriana de las mismas.

10

Antecedentes de la invención

Algunas enfermedades gastrointestinales, tales como úlceras gástricas o duodenales, y especialmente gastritis crónica activa, están estrictamente asociadas a la colonización parcial o difusa de la mucosa gástrica por *Helicobacter Pylori*. Esta bacteria, también conocida como *Campylobacter pylori*, degrada la urea mediante la enzima ureasa. La presencia de *Helicobacter Pylori* en fragmentos de biopsia de mucosa gástrica humana ya ha sido reconocida desde hace varias décadas (Freedberg A.S. y Barron L.E. The presence of spirochetes in human gastric mucosa, 1940, Am J. Dig Dis., 7: 443-5; Marshall B.J. Unidentified Curved bacilli on Gastric epithelium in active chronic gastritis, 1983, Lancet, 1: 1273-5), y su correlación causal con gastritis crónica tipo B está ampliamente documentada (Rauws et al 1988, Gastroenterology, 94: 33-40), así como su implicación en la patogénesis de la úlcera péptica (Peterson W.L. *Helicobacter Pylori* and peptic ulcer disease, 1991, New Eng J. Med, 324: 1042- 8). *Helicobacter Pylori* también se considera un factor de riesgo para la recurrencia de la úlcera duodenal (Coghlan J.G. et al *Campylobacter pylori* and recurrence of duodenal ulcers at 12-month follow-up study. Lancet 1987; 2: 1109-1111).

25

En consecuencia, la erradicación de la bacteria causa la mejora histológica de gastritis, aumenta la probabilidad de curación ulcerosa y es eficaz en la prevención de la recurrencia.

30

El mejor procedimiento para diagnosticar la presencia de *H. pylori* en las biopsias de mucosas gástricas consiste en la combinación de observaciones de cultivo histológicos y bacterianos (Peterson W.L., *Helicobacter Pylori* and Peptic Ulcer Disease, 1991 N. Engl J. Med, 324: 1043-1048), aunque, en algunos estudios, el valor de estos últimos ha sido ampliamente cuestionado (Martínez E., Marcos, A., *Helicobacter Pylori* and peptic ulcer disease, 1991, Lancet, 325: 737).

35

La presencia de *H. pylori* se puede determinar también mediante la búsqueda de anticuerpos de la sangre. Sin embargo, esta prueba puede seguir siendo positiva durante varios meses después de la erradicación de las bacterias, o ser falsamente positiva en el 10-15% de los casos para la reacción cruzada con otros anticuerpos.

40

Otro procedimiento para determinar la presencia de *H. pylori* incluye la prueba de respiración C13, que es cara tanto por el material isotópico como por el equipo necesario.

45

Una prueba alternativa válida utiliza la actividad ureasa de bacterias específicas. Con este fin, se incuba una biopsia de la mucosa en un medio que contiene urea y un indicador de pH sensible al color (Owen R.J. et al, Rapid urea hydrolisis by gastric campilobacters, 1985, Lancet, 1: 111). La ureasa de bacterias en la muestra libera amoniaco a través de la hidrólisis de urea y cuando la cantidad de urea producida es suficiente para elevar el valor de pH del medio, el indicador cambia de color. La ureasa no es producida por el cuerpo humano, de hecho, sólo ocasionalmente fragmentos de biopsia pueden contener ureasa derivada de otras bacterias, sin embargo, otras cepas de bacterias, tales como *Proteus*, *Pseudomonas* y *E. coli*, contienen ureasa en un nivel muy inferior (Kasper G., Dickgiesser N. Isolation from gastric epithelium of *Campylobacter*-like bacteria that are distinct from *Campylobacter pyloridis*, 1985 Lancet, 8420: 111-112). En concordancia con este mecanismo, se han desarrollado diversas pruebas de diagnóstico sobre biopsias de la mucosa. Éstas incluyen las soluciones técnicas reivindicadas por Marshall (patente de Estados Unidos No. 4.748.113, 31 de mayo de 1988) y Jackson (patente de Estados Unidos No. 5.439.801, 8 de agosto 1995).

55

Ambos describen una composición de ensayo que contiene urea que produce amoniaco por la enzima ureasa de *H. pylori*. La reacción produce un aumento del pH del medio que se observa a través del cambio de color del indicador. En la prueba de Marshall, el medio de incubación es un gel que contiene rojo de fenol como indicador de pH, que pasa de amarillo a rojo cuando el amoniaco liberado de la urea aumenta el pH a por lo menos 6,9. El sistema de reacción se tampona de manera que los fragmentos contaminados de la sangre o los fluidos intestinales no aumentan el valor de pH causando un resultado falso positivo. La prueba requiere un tiempo de incubación de 3 horas a 30-40°C y hasta 21 horas adicionales a temperatura ambiente. Aproximadamente el 75% de biopsias infectadas con *H. pylori* muestran un resultado positivo en 20 minutos y el 90% son positivas en 3 horas. Sin embargo, con el fin de verificar los resultados negativos se requieren 24 horas.

65

En las pruebas de Jackson, también realizadas en gel agar, se utilizan dos indicadores de color (rojo de metilo y azul de bromotimol) junto con conservantes (metilparabeno y propilparabeno) en ausencia de sistemas tampón. Más del

95% de las pruebas son positivas en 20 minutos, algunas pruebas pueden tardar una hora, pero todas se vuelven positivas en 4 horas. Por lo tanto, realizando este procedimiento no es necesario esperar 24 horas para asegurarse del resultado final como para la prueba de Marshall. Además, la amplia gama de colores desde color melocotón a verde claro, verde oscuro, azul claro y azul oscuro también proporciona una semicuantificación del nivel de infección. Además, la reacción de la ureasa se produce a un pH por debajo de 6,2, aumentando la especificidad de la prueba debido a que microorganismos distintos de *H. pylori*, tales como *Proteus*, *Pseudomonas*, *E. coli* no reaccionan a pH ácido.

Se han desarrollado otras pruebas: CLO-Test® (Kimberly-Klark, Utah, Estados Unidos), MRU (J Gastroenterol Hepatol 1992; 7: 569-71), Pronto-Dry® (Eur J. Gastroenterol Hepatol 2004 Feb. 16/21 195-9) y RUT (Rapid Urease Test) (S. Afr. Med. J. 2007, 97: 1281-4). Sin embargo, incluso en estas pruebas los límites principales están relacionados esencialmente con su sensibilidad no óptima, especialmente en relación con la necesidad de obtener un resultado seguro en poco tiempo.

En particular, la sensibilidad mostrada corresponde a:
 CLO-test: 15% a los 5 minutos, 60% a los 30 y 88% a las 24 horas;
 Pronto-Dry 30% a los 5 minutos, 50% a los 10 minutos y 90% a los 60 minutos;
 RUT: 70% a los 5 minutos, 91% a las 24 horas;
 MRU: 85% a los 5 minutos, 92% a los 30 minutos. Por lo tanto, también los tiempos de respuesta por parte de estas pruebas, incluso si son inferiores a los anteriores, no garantizan una ejecutabilidad en un paciente ambulatorio.

En particular, las desventajas identificadas en los procedimientos antes mencionados se pueden resumir en los siguientes puntos:

1) Prueba de Marshall

Las biopsias con alta actividad ureasa desarrollan rápidamente color rojo alrededor del fragmento. Sin embargo, en presencia de una pobre actividad enzimática, la baja cantidad de amoníaco aumenta significativamente el tiempo de incubación necesario para obtener el cambio de color. Este inconveniente se debe al rojo de fenol utilizado como indicador que no posee una gama de cambio de color suficientemente ácido (6,9 a 8,4 con un pKa 7,9). Realizar la prueba a un pH mayor que 6,5 puede dar lugar a reacciones de falsos positivos para la presencia de diferentes bacterias de *Helicobacter Pylori* (*Proteus*, *Pseudomonas*, *E. coli*). Estos aspectos reducen la sensibilidad y especificidad de la prueba, además de aumentar el tiempo de incubación requerido.

2) Prueba de Jackson:

El espectro de colores, secundario a los cambios de pH, no es siempre bien diferenciable, especialmente en los valores de pH intermedios entre 5,5-7,0, esta característica hace que el resultado sea incierto (verde claro: negativo; verde oscuro: positivo) en presencia de baja actividad de la ureasa.

Las pruebas disponibles deben mejorarse aún más, aumentando su sensibilidad, reduciendo el tiempo de medición y la posibilidad de resultados falsos negativos, especialmente teniendo en cuenta los factores que pueden causar los resultados falsos negativos, tales como:

- distribución fragmentada de la infección: la enfermedad puede tener una distribución desigual, a fin de evitar resultados falsos negativos, deben extraerse biopsias gástricas y analizarse;
- metaplasia intestinal: *Helicobacter Pylori* no coloniza las zonas de metaplasia intestinal, por lo tanto la presencia generalizada de estas áreas puede dar lugar a un resultado falso negativo; también en este caso, sería adecuado realizar múltiples biopsias de la mucosa;
- la toma de antibióticos y antiseoretos: *Helicobacter Pylori* es sensible a la ingesta de estos medicamentos, que pueden inhibir pero no destruir la infección;
- elección de los indicadores de pH más adecuados.

Los indicadores de pH son ácidos o bases débiles que cambian su estructura molecular en función del pH de la solución con el resultado del cambio de color. Para obtener una sensibilidad razonable, el indicador debe cambiar de color pálido, como el amarillo de la forma no disociada, a fuerte, tal como rojo o azul de la forma disociada. El punto de cambio de color corresponde a la situación en la que la cantidad de la forma no disociada es equivalente a la de la forma disociada ($pK_a = pH$) y el indicador adquiere un color intermedio. De hecho, el punto de cambio de color es suficientemente ancho como para ser considerado como un intervalo de cambio de color que incluye un intervalo de valores $pH = pK_a \pm 1$. De este modo, el indicador de elección debería tener un pK_a un poco por encima del pH inicial de la solución.

La solicitud de patente italiana ITRM20030399 describe una composición para utilizar en la prueba de diagnóstico que explota la ureasa en forma de solución acuosa capaz de revelar rápidamente la presencia de *Helicobacter Pylori* en fragmentos de biopsias. La invención proporciona una solución de ensayo de uso totalmente ambulatorio, ya que su aumento de la sensibilidad ha acortado significativamente el tiempo de respuesta. La composición contiene un 10% de urea en agua desionizada a pH 6,8 y al menos un indicador de pH que tiene un pK_a que varía entre 6,0 y 7,0

y a una concentración tal para determinar un pH final de aproximadamente 5. Sin embargo, esta prueba también tiene ciertas limitaciones: además una gran sensibilidad en un tiempo de reacción de 5 minutos (100%) en el caso de una carga bacteriana alta-moderada, para bajas cargas bacterianas, sólo el 55% de las muestras de ensayo reaccionan en menos de 5 minutos y el 90% cambia de color en 30 minutos. Además, el uso de dos indicadores diferentes no siempre proporciona resultados de lectura fáciles para el cambio sutil de color a valores de pH intermedios (7,0 a 7,9) cerca de los pKa de los reactivos, haciendo cuestionable a veces la interpretación de los resultados en caso de una infección baja por bacterias *H. pylori*. Además, un 10% de urea no asegura un pH suficientemente ácido adecuado para el almacenamiento a largo plazo del reactivo de diagnóstico.

La solicitud de patente de Estados Unidos 5.702.911 se refiere a una composición de ensayo mejorada para el diagnóstico de úlceras gástricas, úlceras duodenales, gastritis, linfoma gástrico y carcinoma gástrico mediante la detección de *Helicobacter Pylori* y la enzima catalasa asociada con tales afecciones. La composición de ensayo es una solución acuosa que contiene de aproximadamente un 0,5% a aproximadamente un 6% de peróxido de hidrógeno, de aproximadamente un 0,5% a aproximadamente un 2,0% de urea, de aproximadamente un 0,001% a aproximadamente de fosfato de sodio monobásico y de aproximadamente un 0,01% a aproximadamente un 0,1% de azul de bromotimol como indicador. Bhasin D.K. et al. en "Relative merits of various rapid biopsy urease tests for diagnosis of *Helicobacter Pylori* (*Campylobacter pylori*) J Assoc Physicians India 38 Supl. 1, 689-691, describe un procedimiento para la detección rápida de *Helicobacter Pylori* que emplea un 5% de urea y una cantidad desconocida de azul de bromotimol como indicador.

Se debe considerar también que, en los últimos años, el uso generalizado de terapias con antibióticos genéricos, ha aumentado la detección de baja carga de *H. pylori*, reduciendo aún más la sensibilidad de las pruebas.

Por lo tanto, todavía se siente fuertemente la necesidad de desarrollar nuevos reactivos y procedimientos para detectar rutinariamente la presencia de *Helicobacter Pylori* en biopsias durante una gastroscopia, lo que permite la reducción de costes y los tiempos de ejecución, alternativos a las técnicas tradicionales de diagnóstico (histología, cultivo, prueba de urea en el aliento), llevados a cabo en biopsias de tejido de la mucosa gástrica utilizando pruebas de mejora basados en la actividad de la ureasa.

Características de la invención

El objetivo principal de la presente invención es proporcionar una composición mejorada para uso diagnóstico que permite detectar de una manera rápida y fiable la presencia de *H. pylori* en fragmentos de biopsia, incluso en caso de carga bacteriana baja.

El problema técnico de proporcionar una composición mejorada para una prueba de diagnóstico que permite detectar de forma rápida y fiable la presencia de *H. pylori* en fragmentos de biopsia, incluso en presencia de una carga bacteriana baja, se resuelve mediante la composición de la presente invención caracterizada por el hecho de que comprende el 5% de urea y azul de bromotimol en solución salina.

Sorprendentemente, se ha encontrado que reduciendo significativamente la cantidad de urea presente en la composición de diagnóstico en comparación con las composiciones del estado de la técnica, la prueba de diagnóstico mejora su rendimiento en términos de sensibilidad y especificidad, estabiliza el pH y permite la detección, de una manera más rápida y más fiable, de la presencia de infección bacteriana base de la úlcera gástrica y úlcera duodenal.

Descripción detallada de la invención

Cabe señalar que para los fines de la presente invención las expresiones: composición de diagnóstico, reactivo de diagnóstico, sustrato de la enzima se usan en este documento como sinónimos.

Un primer objetivo de la presente invención es proporcionar una composición en forma de solución acuosa para llevar a cabo la prueba de diagnóstico que permite detectar rápidamente, durante el análisis por gastroscopia, la presencia de *Helicobacter Pylori* en biopsias de la mucosa gástrica, que comprende el 5% de urea y un indicador de pH que tiene un pKa igual a 7,0 en solución fisiológica (cloruro de sodio al 0,9%).

El valor del pH final de la composición según la presente invención es de aproximadamente 4,8.

Según la presente invención, el indicador de pH es azul de bromotimol, un compuesto orgánico con propiedades ácidas débiles, en su forma normal (ácida) es de color amarillo, mientras que su base conjugada es de color azul. Debido a esta diferencia de color entre las dos formas, el azul de bromotimol se utiliza como un indicador del pH. Además, el azul de bromotimol utilizado en la composición según la presente invención tiene un intervalo adecuado de valores de pH para el cambio de color (en el rango de amarillo-verde-azul) compatible con la presencia de amoníaco producido por la reacción, capaz de discriminar la entidad de la carga bacteriana mediante un cambio de color fácilmente detectable (verde = bajo, azul = intenso).

Esta característica técnica es una indudable ventaja en comparación con la mayoría de las pruebas disponibles en el mercado que utilizan el rojo de fenol como indicador de color, ya que las cargas bacterianas medias a bajas, actualmente las más frecuentes, determinan un cambio de color lento, a menudo no bien definido. Esto se debe a que el cambio de color de amarillo (negativo) a rojo intenso (positivo), pasando por tonos rosados, da como resultado una discriminación incierta entre el rosa muy claro de la biopsia y un color rosa debido a una positividad débil.

Según la presente invención, la cantidad de azul de bromotimol en la composición varía entre el 0,5% y el 10%. Preferiblemente, la cantidad de azul de bromotimol en la composición varía entre el 2% y el 6%, en una realización particularmente preferida de la invención, la cantidad de azul de bromotimol en la composición es del 4%. La composición de diagnóstico según la presente invención es muy sencilla, no requiere la inclusión de conservantes, agentes antimicrobianos, o agentes de tamponamiento. Esta característica contribuye a una reacción de degradación de la urea aún más rápida y, en consecuencia, también la velocidad de detección es máxima. Utilizando la composición de la presente invención, el cambio de color es observable desde la periferia de la biopsia, la gradación de color indica la carga infecciosa presente en la muestra, lo que permite el diagnóstico ya en el final de la investigación endoscópica.

Aunque la reacción de la ureasa que utiliza la composición de la presente invención se lleva a cabo de manera óptima a pH alcalino, ventajosamente la reacción positiva comienza a aparecer a partir de un valor de pH de menos de 6,2. Esto aumenta la especificidad de la prueba, a condición de que varios otros microorganismos distintos de *H. pylori*, tales como *Proteus*, *Pseudomonas* y *E. coli*, puedan estar presentes en la muestra de biopsia, pero no reaccionan en solución a pH ácido, evitando así la posibilidad de respuestas positivas falsas.

La composición según la presente invención es extremadamente sencilla y particularmente estable, esto permite la producción de un sistema analítico en el que la cantidad del reactivo de diagnóstico se puede variar y limitar a la cantidad mínima necesaria para asegurar que la muestra de la biopsia esté completamente sumergida. De esta manera, en el medio de reacción, se produce una alta concentración de amoníaco, lo que provoca un rápido aumento del valor de pH y, por lo tanto, la detección rápida de ureasa.

En una realización preferida de la presente invención, la composición de diagnóstico se prepara inmediatamente antes de su uso mediante la adición a una solución de 0,5%-10% de azul de bromotimol en solución fisiológica, más preferiblemente 4% de azul de bromotimol en solución fisiológica, la cantidad de urea requerida para obtener una concentración final del 5%.

La composición de diagnóstico mejorada de la presente invención se caracteriza por una sensibilidad más alta, y por lo tanto, una mayor especificidad, que las de la técnica anterior, a fin de proporcionar un mejor rendimiento de la reacción que es la base del procedimiento de diagnóstico que permite utilizar la mitad de cantidad de sustrato, es decir, urea. En comparación con el uso de la composición descrita en la solicitud de patente ITRM20030399, que contiene aproximadamente un 10% de urea y dos indicadores de pH, 1% de azul de bromotimol y 2% de rojo de fenol, la sensibilidad de detección y la especificidad de la presente composición se incrementan y se acercan al 100%. Además, fue particularmente interesante el efecto sorprendente determinado por la selección particular del medio disolvente en el que la urea se disuelve, ya que el azul de bromotimol en solución fisiológica resultó ser más estable y sensible que el agua desionizada o una solución hidroalcohólica utilizados como medio disolvente. El uso de una solución de agua-alcohol (60% de solución salina y 40% de alcohol etílico) como medio disolvente para el polvo de urea y el indicador de pH, ha demostrado ejercer un efecto positivo en la solubilización del colorante azul de bromotimol, pero un efecto negativo en la sensibilidad y especificidad de la reacción de detección especialmente en aquellos pacientes que utilizan inhibidores de la bomba de protones y otros fármacos cuya ingesta es notoriamente no recomendada en los días antes del examen endoscópico.

En particular, las principales mejoras que resultan del uso de la presente composición en comparación con las de la técnica anterior incluyen:

- mayor estabilidad del pH de la solución lista para usar;
- mantenimiento de la especificidad al 100%;
- mantenimiento de la sensibilidad al 100% en 5 minutos en el caso de carga bacteriana de alta a moderada,
- aumento de la sensibilidad de hasta el 90% en 5 minutos para una carga bacteriana baja;
- mejor identificación del cambio de color, por lo tanto, mejor lectura de pH intermedio;
- mejor clasificación de la carga de infectividad (baja = verde en la periferia de la biopsia; moderada = azul en la periferia de la biopsia; alta = propagación de azul intenso).

Además, la formulación líquida permite una difusión más rápida del amoníaco resultante de la reacción de la ureasa, y la ausencia de tampones no reduce la velocidad de reacción, disminuyendo el tiempo de reacción de la composición de diagnóstico.

Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar una composición que comprende el 5% de urea y azul de bromotimol que varía entre el 0,5% y el 10%, preferiblemente que varía entre el 2% y el 6%, incluso más

preferiblemente el 4% azul de bromotimol, en solución salina (cloruro de sodio al 0,9%) que tiene un pH = 4,8 para el uso en el diagnóstico rápido y fiable de las bacterias *Helicobacter Pylori* durante gastroscopia.

5 Un objeto adicional de la presente invención es un kit de diagnóstico para la detección ultrarápida de la presencia y de la carga bacteriana de *Helicobacter Pylori* en la biopsia de la mucosa gástrica tomada durante la gastroscopia a través de la evaluación de la actividad de ureasa en muestras de tejido de la biopsia que comprende:

- 10 - un tubo transparente con un fondo redondeado cóncavo fabricado de polietileno, o cualquier otro material plástico con propiedades similares, que contiene 1 ml de 0,5-10% de azul de bromotimol en solución fisiológica; el tubo está equipado con un tapón de rosca, también fabricado de material plástico, que tiene un tanque pequeño, cerrado por medio de un septo, que contiene la cantidad de urea en polvo necesaria, de manera que la solución final es: 5% de urea, 0,5-10% de azul de bromotimol en solución salina (cloruro de sodio al 0,9%) con un pH de 4,8;
- 15 - dos etiquetas adhesivas, una para el registro de los datos a fijar externamente al tubo, la otra con las especificaciones del lote de producción a introducir en el informe para proporcionar la certificación del producto utilizado para la detección de *Helicobacter Pylori*;
- folleto con notas técnicas e instrucciones de uso.

20 La composición de diagnóstico en la forma que precede a la utilización de la misma, en la que el polvo de urea debe añadirse a la solución salina que contiene azul de bromotimol, es decir, cuando el azul de bromotimol y la urea están todavía separados, tiene una vida útil a temperaturas extremas de -9°C y 45°C de dos años; cuando los dos componentes, la solución de azul de bromotimol en solución salina y el polvo de urea, se mezclan juntos, la composición es estable durante 48 horas a temperatura ambiente, y durante más de dos semanas a 4°C.

25 Un objeto adicional de la presente invención es el procedimiento para la detección ultrarápida de la presencia y de la carga bacteriana de *Helicobacter Pylori* en la biopsia de la mucosa gástrica durante la gastroscopia a través de la evaluación de la actividad de ureasa en la muestra de tejido de la biopsia usando la composición de diagnóstico: 5% de urea y 0,5-10% de azul de bromotimol, preferiblemente 4% de azul de bromotimol, en solución fisiológica, que comprende las etapas de:

- 30 - poner en contacto la muestra de la biopsia con la solución de diagnóstico del 5% de urea y azul de bromotimol en solución salina fisiológica que tiene un pH igual a 4,8 mediante la inmersión completa en un ml de solución,
- esperar 5 minutos para el cambio de color para leer el resultado.

35 En una realización particularmente preferida de la presente invención, el procedimiento para la detección ultrarápida de la presencia y de la carga bacteriana de *Helicobacter Pylori* en la biopsia de la mucosa gástrica durante la gastroscopia a través de la evaluación de la actividad de ureasa en la muestra de tejido de la biopsia se implementa a través del uso del kit de diagnóstico, que también es objeto de la presente invención, utilizando la composición de diagnóstico que comprende 5% de urea y 0,5%-10% de azul de bromotimol, preferiblemente 4% de azul de bromotimol, en solución fisiológica que comprende las siguientes etapas:

- 40 - empujar la tapa del tubo para provocar la rotura del septo y a continuación la abertura del depósito interno que contiene polvo de urea, de manera que el polvo de urea se disuelve en la solución de azul de bromotimol;
- agitar el tubo para mezclar los componentes;
- desenroscar la tapa y depositar una o dos muestras de biopsia de la mucosa gástrica en la composición de diagnóstico líquida, sin agitación;
- esperar 5 minutos para el cambio de color.

45 En caso de una carga bacteriana muy baja de la prueba puede tardar 15 minutos.

50 Si el color de la solución total se extendió rápidamente a verde claro, el líquido puede estar contaminado con sangre o bilis presente en la superficie de las pinzas utilizadas para la toma de la biopsia. En este caso, es recomendable extraer la biopsia del tubo y sumergirla en un tubo nuevo.

El uso de la composición de diagnóstico según la presente invención y el procedimiento relativo determina ventajas y beneficios considerables tanto para el operador que realiza la prueba durante la gastroscopia como para el paciente, e influye positivamente en el diagnóstico y el resultado terapéutico del paciente.

55 El uso de la composición de diagnóstico y el procedimiento relativo del mismo según la presente invención permite determinar la carga bacteriana en la mucosa gástrica proporcionando evidencia del nivel bajo, medio, alto de infección, incluso en el caso de que el paciente tome inhibidores de la bomba de protones y fármacos contraindicados en los días de examen endoscópico.

60 Estudio experimental

EJEMPLO 1 - Estudio clínico realizado mediante el uso de la composición de diagnóstico que comprende el 5% de urea, el 4% de azul de bromotimol en solución salina según la presente invención. Se llevó a cabo un ensayo clínico en 318 pacientes para demostrar la eficacia de la composición y el procedimiento relativo según la presente invención, en particular, el estudio fue dirigido a demostrar la alta sensibilidad de la composición también hacia aquellos pacientes que habían tomado protectores gástricos antisecretores, de tipo lansoprazol, que reducen la

actividad de la enzima ureasa y hacen que la reacción de la enzima sea mucho más lenta para ser realizada durante la gastroscopia o inmediatamente después.

5 Los 318 pacientes incluidos en el estudio fueron divididos en dos grupos. El primer grupo incluyó 255 pacientes que no habían tomado ningún fármaco protector gástrico antisecretores y 63 pacientes que habían tomado protectores gástricos antisecretores. Para validar los resultados de la prueba de diagnóstico según la presente invención, todos los pacientes fueron sometidos a análisis de la presencia de *H. pylori* al mismo tiempo con tres técnicas diferentes:
- prueba rápida en la biopsia según el procedimiento de la invención,
- examen histológico de la biopsia;
10 - prueba del aliento (prueba del aliento con urea).

El examen histológico de la biopsia y las pruebas de respiración (prueba de aliento con urea) se llevaron a cabo según técnicas conocidas por expertos en el sector, mientras que la prueba rápida en la biopsia se llevó a cabo con la composición de la presente invención. En particular, a partir de la mucosa gástrica se extrajo una biopsia de aproximadamente 1 mm³ de tamaño y se colocó en el tubo de ensayo descrito que contiene la composición de diagnóstico de la invención a analizar. La composición de diagnóstico se obtiene mezclando la cantidad apropiada de urea en la solución de azul de bromotimol con el fin de tener una solución final lista para utilizar de 5% de urea y 4% de azul de bromotimol en solución salina fisiológica que tiene un pH igual a 4,8.

20 Resultados

La prueba de diagnóstico usando la composición según la presente invención ha mostrado una especificidad del 100% y una sensibilidad global del 93%, en la que el 100% para una carga intermedia alta de *H. pylori* y un 92% para una carga muy baja de *H. pylori*.

25 De los 295 pacientes analizados en el primer grupo que no habían tomado ningún fármaco protector gástrico antisecretores (lansoprazol), 185 pacientes no resultaron afectados por infección con *Helicobacter Pylori* y 110 pacientes resultaron afectados; los resultados obtenidos por la prueba han sido confirmados por los datos obtenidos con los otros dos procedimientos de diagnóstico. Nueve casos han mostrado una discrepancia de los resultados debido a que la prueba rápida fue negativa, también en una lectura después de 24 horas, mientras que se mostró un resultado positivo de bajo nivel mediante la histología y la prueba de respiración (falso negativo).

En el segundo grupo, se encontraron 41 biopsias sin *H. pylori* y 62 con la infección bacteriana. 4 biopsias obtuvieron un resultado dudoso: eran negativas, también en una lectura después de 24 horas, mientras que la prueba del aliento y/o el examen histológico fueron ligeramente positivos.

Así, de los 398 pacientes incluidos, 385 han demostrado una correlación rápida de la prueba con al menos uno de los otros ensayos, por lo tanto, la prueba ha demostrado un 100% de especificidad y una sensibilidad global del 93%.

40 No aparecieron diferencias en la sensibilidad y especificidad en ambos grupos con y sin fármacos protectores gástricos antisecretores.

Los resultados de este estudio demuestran que la composición y el procedimiento según la presente invención son una herramienta útil para la detección de *H. pylori* que se puede ejecutar directamente durante la investigación con gastroscopia, con alta sensibilidad y especificidad de resultado igual al 93% y 100 % respectivamente, particularmente útil y ventajosa es la alta fiabilidad del resultado, incluso en los pacientes que toman antisecretores en los días de gastroscopia.

50 EJEMPLO 2 - Estudio clínico realizado mediante el uso de la composición de diagnóstico que contiene el 10% de urea en agua desionizada a pH 6,8, 1% de azul de bromotimol y 2% de rojo de fenol.

Mediante el uso de una composición de diagnóstico que contiene el 10% de urea en agua desionizada a pH 6,8, 1% de azul de bromotimol y el 2% de rojo de fenol, tal como se describe en la solicitud de patente ITRM20030399, se obtuvo una sensibilidad global del 88% en comparación con los datos histológicos identificados como la referencia estándar para el diagnóstico de la presencia de la bacteria. En este caso, el estudio incluyó 86 pacientes no tratados con fármacos protectores gástricos antisecretores; de los 86 pacientes, 29 resultaron sin *H. pylori* y 57 resultaron estar infectados. De estas 57 biopsias infectadas, 7 tenían una alta carga bacteriana, 27 presentaron una carga intermedia, 23 un nivel de infección bajo. De estas 23 muestras de biopsia con carga bacteriana muy baja, 7 no han reaccionado en la prueba de diagnóstico que utiliza la composición que contiene el 10% de urea en agua desionizada a pH 6,8, el 1% de azul de bromotimol y el 2% de rojo de fenol.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición para detectar rápidamente la presencia de *Helicobacter Pylori* en muestras de biopsia de la mucosa gástrica durante el análisis por gastroscopia **caracterizada por que** comprende el 5% de urea y 0,5-10% de azul de bromotimol en solución salina que tiene un pH igual a 4,8.
2. Composición, según la reivindicación 1, en la que la concentración de azul de bromotimol en solución salina varía entre el 2% y el 6%.
- 10 3. Composición, según las reivindicaciones 1 o 2, en la que la concentración de azul de bromotimol en solución salina es del 4%.
- 15 4. Composición que comprende el 5% de urea y el 0,5-10% de azul de bromotimol en solución salina que tiene un pH igual a 4,8 adecuada para el uso en el diagnóstico de la carga bacteriana de *Helicobacter Pylori* en la biopsia de la mucosa gástrica durante el análisis gastroscópico.
5. Composición, según la reivindicación 4, en la que el azul de bromotimol en solución salina es del 4%.
- 20 6. Composición, según las reivindicaciones 4 y 5, adecuada para usar en un procedimiento que comprende las siguientes etapas:
- poner en contacto la muestra de la biopsia con la composición mediante la inmersión completa en un ml de solución,
- esperar 5 minutos para el cambio de color para leer el resultado.
- 25 7. Kit de diagnóstico para la detección rápida de la presencia y de la carga bacteriana de *Helicobacter Pylori* en una biopsia de la mucosa gástrica tomada durante una gastroscopia, que comprende:
- un tubo transparente con un fondo redondeado cóncavo fabricado de polietileno, o cualquier otro material plástico con propiedades similares, que contiene 1 ml de 0,5-10% de azul de bromotimol en solución fisiológica; estando el tubo equipado con un tapón de rosca, también fabricado de material plástico, que tiene un tanque pequeño, cerrado por medio de un septo, que contiene la cantidad de urea en polvo necesaria, de manera que la solución final es: 5%
30 de urea, 0,5-10% de azul de bromotimol en solución salina (cloruro de sodio al 0,9%) con un pH de 4,8;
- dos etiquetas adhesivas, una para el registro de los datos a fijar externamente al tubo, la otra con las especificaciones del lote de producción a introducir en el informe para proporcionar la certificación del producto utilizado para la detección de *Helicobacter Pylori*;
35 - folleto con notas técnicas e instrucciones de uso.